

Uttrycket av AZIN2 i brosktumörer

Robert Östman

Medicine Kandidat

Medicinska fakulteten vid Helsingfors Universitet

Helsingfors 2016

Avhandling

robert.ostman@helsinki.fi

Handledare: Leif Andersson, Tom Böhling

HELSINGFORS UNIVERSITET

Medicinska fakulteten

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos – Institution – Department	
Medicinska Fakulteten			
Tekijä – Författare – Author			
Robert Östman			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Expression av AZIN2 i brosktumörer			
Oppiaine – Läroämne – Subject			
Medicin			
Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal - Number of pages	
Avhandling	Oktober 2017	27	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Ornitin dekarboxylas antizym-inhibitorer (AZIN) är protein som reglerar polyaminsyntesen. Två AZIN proteiner är kända hos människan (AZIN1/AZIN2). Polyaminer fungerar på flera olika sätt vid cellens proliferation, vilket har lett till stort intresse för deras roll inom neoplastiska förändringar. AZIN1 har betydelse för cellens proliferation, medan AZIN2 har visats ha en större roll vid cellulär vesikeltransport. AZIN2 har ett högt uttryck i sekretoriska celler, bland annat i broskvävnad.</p> <p>Studiens målsättning är att undersöka AZIN2 uttrycket i benigna och maligna neoplasier av brosk. Syftet är att utreda huruvida uttrycket av AZIN2 varierar mellan olika graderna av malignitet. Ifall betydande skillnad finns kunde detta komma till användning vid graderingen av neoplasier för bedömningen av malignitet. Uttrycket av AZIN2 undersöktes med immunohistokemiska färgningar av preparat insamlade från patienter som blivit opererade för kondrom eller kondrosarkom.</p> <p>Studien visar att uttrycket av AZIN2 sjunker vid stigande grad av malignitet ($p=0.039$). Den visar också att expressionen signifikant sjunker om tumören klassats som benign/lågmalign/högmalign ($p=0,016$) eller lågmalign/högmalign ($p=0,004$).</p> <p>Resultaten visar att tumörens uttryck av AZIN2 sjunker vid stigande grad av malignitet. De bekräftar även tidigare fynd av AZIN2:s roll för vesikel transport i cellen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
AZIN2; Chondrosarcoma; Chondroma;			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

INNEHÅLL

1 INLEDNING	1
1.1 KONDROM OCH KONDROSARKOM	1
1.1.1 <i>Broskvävnad, kondrom och kondrosarkom</i>	1
1.1.2 <i>Epidemiologi</i>	3
1.1.3 <i>Etiologi och Patogenes</i>	4
1.1.4 <i>Morfologi</i>	4
1.1.5 <i>Differentialdiagnostik och gradering av kondrosarkom</i>	5
1.1.6 <i>Diagnostik och vård</i>	6
1.1.7 <i>Prognos</i>	7
1.2 ANTIZYM INHIBITOR 2	7
1.2.1 <i>Polyaminers funktion och reglering</i>	7
1.2.2 <i>Antizymer och Antizym-inhibitorer</i>	8
2 STUDIENS MÅLSÄTTNING	8
3 METODER OCH MATERIAL	9
4 RESULTAT	11
4.1 PATIENTMATERIALET	11
4.2 TUMÖRERNAS LOKALISATION	12
4.3 MIKROSKOPISK ANALYS AV IHK FÄRGAD PREPARAT	12
4.4 STATISTISK ANALYS AV PREPARAT	13
4.5 TABELLER OCH DIAGRAM	14
4.6 BILDER	18
5 DISKUSSION	21
6 LITTERATUR	24

1 Inledning

1.1 Kondrom och kondrosarkom

1.1.1 Broskvävnad, kondrom och kondrosarkom

Broskvävnad är en del av det muskeloskeletala systemet. Broskvävnad kan delas in i tre olika beståndsdelar: Kondrocyter, dvs broskceller, det extracellulära matrixet (ECM) samt den omkringliggande bindvävshinnan, perikondriet. Kondrocyterna som är utspridda i ECM i små hålrum, "lacunae" bildar molekyler som bygger upp ECM. Broskvävnad består till största del av extracellulärt matrix. ECM innehåller höga koncentrationer av glukosaminoglykaner (GAG), proteoglykaner, kollagen (typ 1 och 2) och elastiska fibrer. Olika sammansättningar av dessa molekyler, tillsammans med deras elektrostatiske samverkan, ger broskvävnaden dess fysikaliska egenskaper. Molekyler i ECM drar åt sig stor mängd vatten, vilket underlättar diffusion av näringsämnen från det vaskulära perikondriumet till den inre avaskulära broskvävnaden. Vattnet fungerar dessutom som stötdämpare vid mekanisk kompression av vävnaden, vilket är en viktig fysikalisk egenskap för brosk. I den tättsittande bindvävshinnan på broskets yta, perikondriet, finns celler som i princip är oskiljbara från fibroblaster och förstadiyeceller till kondrocyter. Här finns också de blodkärl som försörjer broskvävnaden. Broskvävnadens uppgifter är mångfaldiga, bl.a. tillväxten av ben, skyddande av benvävnad vid ledytor och funktion som stödjevävnad vid områden där mera flexibel vävnad än ben behövs (t.ex. thorax, näsvingen, örat). Vävnaden kan delas in i tre huvudtyper, hyalint brosk, elastiskt brosk och fibrotiskt brosk. (1)

Kondrom (ICD-10 D16) och kondrosarkom (ICD-10 C40.92) är samlingsnamn för neoplasier som utgår från förstadiyeceller och differentierar mot kondrocyter. Kondrom är den benigna formen och kondrosarkom är den maligna. (2,3) Kondrom uppkommer i hyalint brosk. De kan uppstå på olika ställen i ben och har då också olika benämningar. Ett kondrom i benmärgen kallas enkondrom och ett kondrom vid benytan kallas periostealt kondrom eller jukstakortikalt kondrom. (2) Enkondrom är den vanligaste intraosseala bentumören. (3) Det finns också vissa sjukdomstillstånd där multipla kondrom hör till sjukdomsbilden. Vid Olliers syndrom uppkommer multipla enkondrom (enkondromatos). Om dessutom hemangiom i mjukvävnad hittas i samband med enkondromatos kallas tillståndet Maffucci syndrom. (2-4) Ett enkondrom går ofta symptomlöst och hittas som

bifynd vid radiologiska undersökningar. (5) Enkondromatos kan ändå leda till missbildningar av rörben. (3)

Kondrosarkom är en malign bentumör där cellerna bildar hyalin broskvävnad. (2,3,6) Primära maligna neoplasier i ben är relativt ovanliga, med osteosarkom som den vanligaste formen och kondrosarkom som den nästvanligaste. (3,7) Ett konventionellt kondrosarkom uppstår i ben och växer intramedullärt. (3,8) Kondrosarkom kan vara primära eller sekundära, beroende på om tumören uppkommit spontant eller om ett kondrom maligniserats. Sekundära kondrosarkom är ovanliga (2 % av alla kondrosarkom) och uppstår oftast från enkondrom. (8) Det är svårt att avgöra om ett kondrosarkom uppstått primärt eller sekundärt, så incidensen av sekundära kondrosarkom kan vara större. (7) Vid tillstånd med multipla bendysmorfier såsom multipel hereditär exostos, Olliers sjukdom eller Maffucci syndrom är maligniseringsrisken för ett enkondrom betydligt större. (2) Kondrosarkom kan subklassificeras som intramedullära eller juxtacortikala beroende på lokalisation och kan vidare klassificeras på basen av morfologi. Runt 85 % av kondrosarkomen är konventionella (? Klassiska?). (2)

Kondrosarkomen graderas histologiskt från gradus 1 till gradus 3 med ökande atypi. (2,6) Majoriteten av kondrosarkomen är av gradus 1. Beroende på graden och lokalisation kan man också uppskatta sannolikheten för metastasering. Vid ett gradus 1 kondrosarkom är risken liten men i en gradus 3 tumör ökar risken till 70 %. (6,9) Intressant nog har lokaliseringen av kondrosarkom en inverkan på metastasering, med en klart mindre metastasrisk vid kondrosarkom i händernas rörben. (8) Metastaseringen följer modellen för andra sarkom, där metastaser oftast förmedlas hematologiskt och vanligen hittas i lungorna. Bedömningen av metastaseringsrisken har visat sig vara svår, eftersom den histologiska bilden inte alltid korrelerar med tumörens aggressivitet. (2,10)

Kondrom och låggradigt kondrosarkom har väldigt liknande egenskaper, vilket gör differentialdiagnostiken svår. Oftas krävs både histologisk och klinisk bild för att avgöra om tumören skall bedömas som benign eller malign. Man kan således påstå att kondrom och kondrosarkom är delar av ett spektrum, vilket medför att differential diagnostiseringen av dem är svårare. (11)

Det finns även andra broskbildande tumörer än konventionella kondrom och kondrosarkom. Osteokondrom, kondroblastom, kondromyxoida fibrom, mjukvävnads kondrom samt synovial kondromatos är alla benigna neoplasier av broskvävnad. I denna studie har endast inkluderats fall där kondrom har konstaterats genom patologisanatomisk diagnos (PAD). Kondrosarkom har också varierande former. Till dessa kan man räkna dedifferentierat kondrosarkom, mesenkymalt kondrosarkom eller klarcelligt kondrosarkom. Denna studie begränsar sig till konventionella (klassiska?) kondrosarkom som diagnostiserats via PAD.

1.1.2 Epidemiologi

Neoplasier av brosk är ovanliga. Kondrom hittas ofta som bifynd vid radiologiska undersökningar, vilket försvårar en uppskattning av incidensen. Maligna tumörer av ben/brosk (ICD-10 C40-C41) är ovanliga i Finland, med en årlig incidens på mellan 20-30 fall hos män och 16-26 hos kvinnor. (12,13) Kondrosarkom räknas ha en incidens på runt 10-15 fall per år i Finland (3), vilket visar att kondrosarkom ändå orsakar en stor del av de maligna fallen av ben/brosk tumörer.

Kondrom är den vanligaste benigna interosseala tumören (3,7). Tumören hittas vanligen hos patienter i åldern 20-40, men kan hittas hos individer allt från 5 till 80 år (3,14). Incidensen skiljer sig inte mellan män och kvinnor. Kondrom drabbar vanligtvis endast ett ben, men vid enkondromatos tillstånd tillhörande Olliers sjukdom eller Maffucci syndrom uppkommer multipla tumörer. Patienter med Olliers sjukdom räknas ha en 25% risk att utveckla sekundärt kondrosarkom före 40 års ålder. Risken är ännu högre i patienter med Maffucci syndrom. (14) Olliers sjukdom har en incidens på 1/100 000 patienter medan Maffucci syndrom är väldigt ovanligt. (4) Risken för att ett ensamt kondrom skall maligniseras är svårt att uppskatta, men antas ligga runt 1-2%. (15) Ungefär hälften av kondromen uppkommer i händernas och fötternas små ben. De långa rörbenen, proximala humerus och proximala samt distala femur är de näst vanligaste områden. Kondrom uppkommer sällan i platta ben som revben, skulderblad eller bröstbenet. De kraniofaciala benen drabbas mycket sällan. (14)

Kondrosarkom är den näst vanligaste bentumören efter osteosarkom, med en incidens på 10-15 fall per år i Finland (se ovan! Repetition). (3) Kondrosarkom representerar runt 25 % av de maligna bentumörerna. Kondrosarkom uppkommer vanligtvis vid senare ålder (50+) och har en lite högre

incidens hos män. (14) Hos unga hittas kondrosarkom väldigt sällan och hör oftast till de ovanligare typerna av kondrosarkom, såsom klarcelligt eller mesenkymalt kondrosarkom. Tumörerna uppkommer vanligtvis i höftbenet, axelområdet (proximala humerus) och i proximala eller distala femur. Kondrosarkom uppkommer sällan i distala delar av extremiteterna. Kondrosarkom uppstår som primära tumörer i en majoritet av fallen (90 %). (14)

1.1.3 Etiologi och Patogenes

Den exakta etiologin och patogenesen för kondrom och kondrosarkom är till stora delar oklar. De har båda sin början i stamceller som differentierar till kondrocyter. Det har spekulerats att enkondrom utgår från kondrocytstamceller vid epifysealplattan. Cellerna har ett förändrad uttryck av Hedgehog proteiner vilket gör att cellerna inte mognar. Samma förändrade signalering har också hittats i kondrosarkom. Denna rutt har också visat sig vara av betydelse vid utveckling till enkondromatos (Olliers och Maffucci syndrom). (11) I kondrosarkom har också "insulin-like growth factor" (IGF) och p53 mutationer visat sig ha betydelse i patogenesen, vilket stämmer överens med liknande fynd i andra sarkom. (16) Man har även visat att mikroRNA uttrycket är förändrat i kondrosarkom jämfört med vanliga kondrocyter. (17) Den kliniska betydelsen av detta är ännu oklar. (18)

1.1.4 Morfologi

Makroskopiskt är kondrom oftast under 3cm och mycket sällan över 5cm i diameter. Tumörvävnaden skiftar i grått, blått och vitt och kan också vara genomskinlig. Detta stämmer väl överens med utseendet hos normalt hyalint brosk. Intakta tumörer har tydliga marginaler. Tillväxten är olika beroende på lokalisering. I händerna hittas ofta enhetligt växande tumörer, medan man i de långa rörbenen ofta hittar multinodulära tumörer, där knutorna åtskiljs av benmärg. (3,14) Mikroskopiskt liknar kondrom ofta vanligt hyalint brosk men med en högre grad av cellularitet. Det kan vara mycket svårt att skilja mellan kondrom och ett lågradigt kondrosarkom. Histologiskt skiljer sig ändå tillväxtsätten, där kondrom har ett nodulärt utseende medan kondrosarkom ofta har ett mera enhetligt mönster. (19,20) Kondrom växer inte heller invasivt, vilket är den viktigaste åtskiljande faktorn mellan en benign och en malign brosktumör. (2)

Kondrosarkom har ofta sin början i benets medulla och bildar därifrån en glansig massa som växer in mot benets kortex. Tillväxten kan orsaka erosion och förstörelse av den normala benvävnaden. Den invasiva växten kan också nå ut till mjukvävnaden runt omkring benen. Tumören är till sitt makroskopiska utseende genomskinligt med grå-, blå-, vitskiftande färg vilket också vittnar om hyalint brosk. Tumörtillväxten är lobulär med zoner av myxoid eller mucinöst material. Gul-vita förkalkade områden vittnar om mineralisering i benvävnaden. Mikroskopiskt ses en stor mängd broskmatrix med lobulär tillväxt. Loberna skiljer sig både i storlek och form. Loberna växer invasivt i omgivande vävnad. (2,3,14)

1.1.5 Differentialdiagnostik och gradering av kondrosarkom

Det är av stor klinisk betydelse att kunna skilja mellan ett kondrom och ett kondrosarkom. Som tidigare nämnts är det svårt att skilja på det benigna kondromet och ett lågradigt kondrosarkom. Biologiska markörer för att urskilja en benign brosktumör från malign har än inte fått klinisk tillämpning, även om studier av potentiella sådana finns (21). Hittills är en diagnos gjord av en patolog med expertis inom området den mest säkra, även om stor variabilitet också finns mellan patologer. (11,22,23) Patologens analys baseras på symptom, anatomisk lokalisation av tumören, radiologisk undersökning samt histologisk undersökning. (5) Vårdlinjerna är ändå så pass liknande vid ett kondrom och ett lågradigt kondrosarkom att graderingen minskat i betydelse för kliniskt beslut. (6) Man kan påstå att kondrom och kondrosarkom bildar ett spektrum, där graden av dysplasi, mitotisk aktivitet, nukleär atypi och invasiv tillväxt ökar ju högre graden blir. (11,24) Kliniskt finns det vissa skillnader som kan ge en fingervisning till om tumören är benign eller malign. Till dessa hör tumörens storlek, hur medullärt i benet tumören ligger, hur proximalt benet med tumören är samt patientens ålder. (8)

Graderingen av kondrosarkom är viktig men också svår. För kondrosarkom används två olika skalor för gradering, en skala från 1-3 och en annan från 1-4. (8) För kliniska ändamål är det ändå fördelaktigt att använda ett 1-3 graderingssystem, med ökande malignitetsgrad från låg till höggradig malignitet. (6,8) Ett gradus 1 kondrosarkom är lågcellulärt med enstaka mitoser samt hyperkromatiska celler med liknande utseende. Det extracellulära matrixet är ännu välutvecklat i tumören. Den cytologiska bilden är svår att urskilja från kondrom. Ett gradus 1 kondrosarkom

metastaserar sällan (9). Ett gradus 2 kondrosarkom är mera cellulärt, kärnornas atypi ökar och varierar till större del och cellerna är hyperkromatiska. Metastaserisken ökar markant från ett gradus 1 kondrosarkom. Detta är oroväckande, eftersom en viss intervariabilitet bland patologer förekommer vid differentialdiagnostik av gradus 1 och 2.(6) I ett gradus 3 kondrosarkom tilltar de förändringar som redan nämnts men i så hög grad att man knappt mera känner igen vävnaden som brosk. Den mitotiska aktiviteten är hög, det extracellulära matrixet har nästan helt försvunnit, cellerna är atypiska och hyperkromatiska. Ett gradus 3 kondrosarkom har en 70 % risk för metastaser, vilket igen poängterar hur viktigt det är att kunna gradera kondrosarkomen. (8) Graderingen försvåras ännu av det faktum att en tumör inte behöver vara uniform till sin cytologiska bild dvs en höggradig tumör kan innehålla områden med histologiskt låggradiga områden. Man har också observerat att kondrosarkom verkar kunna öka i malignitetsgrad med tiden. Detta passar också in på statistiken som visar att återfallstumörer av kondrosarkom ofta har högre malignitetsgrad än primärtumören. (8)

1.1.6 Diagnostik och vård

Kondrom är den vanligaste interosseala broskbildande tumören och hittas vanligtvis i extremiteternas små rörben. (5,7,25) Ofta är de expansiva och synliga som en tydlig utväxt i benet som kan ge ömmande symptom eller vara symptomfria. Patologiska frakturer av dessa ben är vanliga. (5) Kondrom kan också hittas i de större rörbenen, såsom proximala humerus eller femur. (5) I större ben är tillväxten ofta intramedullär och inte lika expansiv till tillväxten, vilket ofta gör att tumören går symptomlös. Kondrom hittas ofta som bifynd vid radiologiska undersökningar. (2,5) Radiologiskt ses kondrom som marginaliserade tumörer som kan vara radiologiskt genomskinliga eller mineraliserade. Mineraliseringen är kännetecknande för kondrom. Behandlingen av kondrom är kirurgisk. (3)

Kondrosarkom uppkommer ofta med en lokal smärta som första symptom. Symptomen kan ha pågått en längre tid och blivit värre. Patienter klagar också ofta på ökande smärta på natten. Patologiska frakturer är vanligare i höggradiga kondrosarkom och kan ge fingervisning om graden vid presentationen. (26) Radiologiskt ses liknande fynd i nativröntgen som vid kondrom. Med MRI kan man undersöka huruvida tillväxten nått in i omkringliggande mjukvävnad och med DT kan man undersöka kalcificeringsgraden av tumören. (5,24) Den enda kurativa behandlingen av kondrosarkom är kirurgisk. (8,24) Målet är att kirurgiskt avlägsna hela tumören med god marginal.

På grund av broskets naturliga egenskaper är andra vårdmetoder som cytostatika eller radiologiska behandlingar inte till nytta vid behandling av kondrosarkom. (26)

1.1.7 Prognos

Kondrom är en benign tumör som ofta kan tas bort kirurgiskt. Lokala återfall är ovanligt. I vissa fall kan ett kondrom återkomma flera år senare. Vid dessa tillfällen finns en större risk att kondromet maligniseras. (14) Vid enkondromatoser (Olliers eller Maffucci syndrom) är återfall vanligare och maligniseringen är också vanligare (25-30 % risk). Vanligtvis utvecklas ett lågradigt kondrosarkom, men även mera höggradiga sarkom som osteosarkom eller dedifferentierat kondrosarkom är möjliga. (4,14)

Prognostiska faktorer vid kondrosarkom kan delas in i histologisk bild och andra prognostiska faktorer. Histologiska prognosinstrument är bl.a. tumörens malignitetsgrad, mängden tumörnekros, mitotisk aktivitet och mängden myxoid matrix i tumören. Den histologiska graderingen är den viktigaste prognostiska faktorn för lokala återfall och metastas. (14) Dock måste man som tidigare konstaterats ta i beaktande tumörens lokalisering, eftersom tumörer i händerna oberoende av malignitetsgrad sällan metastaserar. (8) Andra faktorer som är av prognostisk betydelse är tumörens storlek, invasivitet, förekomsten av patologiska frakturer, återfall med metastaserad sjukdom och kirurgiska marginaler vid excision. Kirurgiska marginalerna är viktiga eftersom man visat att en tumör som inte tagits bort helt har större risk för återfall och sänker prognosen. Fem års överlevnaden vid kondrosarkom gradus 1 är 89 % medan den kombinerade gruppen av kondrosarkom gradus 2 och 3 har en fem års överlevnad på 53 %. (14)

1.2 Antizym Inhibitor 2

1.2.1 Polyaminers funktion och reglering

Polyaminer är naturligt förekommande polykationiska alkylaminer. (27) Till polyaminerna räknas molekylerna spermidin och spermin samt deras förstadiemolekyl putrescin. (28) Polyaminernas roll i cellens fysiologi har länge studerats. Uptag och biosyntes av polyaminer i celler har visats öka vid cellproliferation. Polyaminerna fungerar bl.a. i nukleinsyrametabolismen, upprätthållandet

av DNAs kromatinstruktur, regleringen av specifika genexpressioner, jonkanalernas reglering, upprätthållande av stabiliteten i cellmembran och vid neutralisering av fria radikaler. (27) I däggdjurscellens biosyntes av polyaminer finns fyra i stort sett irreversibla steg. Det första steget i syntesen av polyaminer är dekarboxyleringen av ornitin för att bilda putrescine. Reaktionen katalyseras av ornitin dekarboxylas (ODC). ODC är ett enzym vars intracellulära aktivitet är motsatt proportionell med koncentrationen intracellulära polyaminer. ODC aktiviteten är kopplad till cellens behov att syntetisera polyaminer. ODC aktiviteten är därför strängt reglerad med så kallade "antizym", där antizymerna binder till ODC och håller det enzymet inaktivt. (29) Polyaminer påverkar sin egna intracellulära koncentration negativt. (30) En ökad koncentration polyaminer har kopplats till ökad celldelning, minskad apoptos och via det till cancer. Minskade halter av polyaminer har visat sig ha en motsatt effekt. (31) Polyaminmetabolin har därför länge varit potentiella mål för cancer läkemedel. (27)

1.2.2 Antizymer och Antizym-inhibitorer

Den intracellulära koncentrationen av polyaminer styrs långt av proteiner med samlingsnamnet "antizym" (AZ). (32) AZ sköter den här uppgiften på två sätt. AZ binder till ODC och försnabbar degraderingen av enzymet och minskar således på biosyntesen av polyaminer. Antizymen kan också hindra endocytosen av polyaminer från extracellulära utrymmen. En ökning i den intracellulära koncentrationen av polyaminer ökar på biosyntesen av AZ. (33) Antizymernas effekt regleras i sin tur av ornitin dekarboxylas homologa proteiner, antizym inhibitorer (AZIN). Det finns två kända AZIN molekyler (AZIN1 och AZIN2). (34) AZIN molekylerna inhiberar AZ och således ökar aktiviteten av ODC vilket ökar polyaminsyntesen. AZIN molekylerna ökar alltså den intracellulära koncentrationen av polyaminer. (33) I den här studien har vi koncentrerat oss på AZIN2. AZIN2 skiljer sig från AZIN1 dels genom sin vävnadsspecificitet och dels via uppgiften proteinet har i cellen. AZIN1 hittas i stort sett alla celler i kroppen, medan AZIN2 hittas speciellt i hjärnan, testiklar och mastceller. AZIN2 har en liknande affinitet till AZ som AZIN1 och inducerar aktivering av ODC. (35-38) AZIN2 har ändå visats ha en större funktion inom den intracellulära vesikel transporten i olika endokrina celler. (39) AZIN2 proteinets funktion har medfört ny insikt i polyaminers roll vid intracellulär transport. (35)

2 Studiens Målsättning

Studiens målsättning är att undersöka AZIN2 expressionen i kondrom och olika grader av kondrosarkom. Tanken är att undersöka ifall expressionen är olika i benigna och maligna tumörer och om expressionen korrelerar med tumörens malignitetsgrad och om AZIN2 på detta sett kunde fungera som en diagnostisk markör. Uttrycksnivån undersöks genom immunohistokemiska färgningar av insamlade preparat från patienter som blivit opererade för kondrom eller kondrosarkom.

3 Metoder och Material

Studien är retrospektiv där patientdata för preparatinsamling hämtats från patologiregistret Qpati vid HUSLABs centrallaboratorium. Ur Qpati söktes patienter som fått diagnosen "Chondroma" eller "Chondrosarcoma". Studien har etiskt tillstånd.

För kondrom gjordes ingen skillnad mellan enkondrom eller juxtakortikalt kondrom. Från sökningens patientjournaler valdes patienter som behandlats kirurgiskt och fått sin diagnos via post-operativt PAD. Detta på grund av den större tillförlitligheten till diagnosen av hela tumören jämfört med biopsier. Från materialet uteslöts fall där diagnosen varit annat än konventionellt kondrosarkom, om tumören ansetts vara recidiv från tidigare samt material som samlats in före 2008. Totalt valdes 25 fall med diagnosen kondrom, 14 fall av kondrosarkom gradus 1, 17 fall av kondrosarkom gradus 2 och 6 fall av gradus 3.

För undersökning av AZIN2 expression användes immunohistokemisk metod. Paraffin block samlades från arkiven för patologiska avdelningen på Helsingfors Universitet och HUSLAB. Från dessa tillverkades 4-µm tjocka snitt som deparaffinerades med xylol och rehydrerades med sjunkande koncentrationer av etanol ända till destillerat vatten. Preparaten färgades sedan med en antikropp specifik för AZIN2 (K3). Metoden har beskrivits i detalj (40).

Efter färgning uteslöts två fall av kondrom och ett fall av kondrosarkom gradus 1. Detta på grund av tekniska problem vid färgning. Den resterande mängden preparat undersöktes mikroskopiskt. Expressionen av AZIN2 bedömdes via mikroskop av två forskare, och graderades subjektivt i 3 grader. Dessa innefattar negativ, svagt positiv och starkt positiv.

För den statistiska analysen delades positiviteten in i följande grupperingar:

1. Negativa eller positiva för AZIN2
2. Negativa, svagt positiva eller starkt positiva för AZIN2

Vidare jämfördes nivån av AZIN2 uttryck inom de olika diagnoserna av tumörerna samt kliniskt betydande grupperingar av tumörer:

1. Kondrom, Gradus 1 Kondrosarkom, Gradus 2 Kondrosarkom versus Gradus 3 Kondrosarkom
2. Benigna versus maligna tumörer (Kondrom versus kondrosarkom)
3. Benigna, lågmaligna versus högmaligna tumörer (Kondrom, Gradus 1 Kondrosarkom versus Gradus 2 Kondrosarkom + Gradus 3 Kondrosarkom)
4. Lågmaligna versus högmaligna tumörer (Kondrom + Gradus 1 Kondrosarkom versus Gradus 2 Kondrosarkom + Gradus 3 Kondrosarkom)

Grupperingen av tumörerna baserar sig på klinisk signifikans. Den första gruppen är indelad enligt malignitetsgrad. Den andra gruppen delar in tumörerna enligt benigna eller maligna. Den tredje gruppen delar in tumörerna enligt metastaseringsrisk, enligt vad som tidigare presenterats. (9) Den fjärde gruppen har kondrom och Gradus 1 kondrosarkom inom låg metastasrisk tumörer, detta pga. den svåra differentieringen mellan dem. (11)

För den statistiska analysen ställdes följande nollhypoteser:

1. Fördelningen av positiva eller negativa fall är lika oberoende om tumören är benign eller malign
2. Fördelningen av positiva eller negativa fall är lika oberoende tumörens malignitetsgrad
3. Fördelningen av negativa, svagt positiva och starkt positiva fall är lika oberoende om tumören är benign eller malign
4. Fördelningen av negativa, svagt positiva och starkt positiva fall är lika oberoende tumörens malignitetsgrad
5. Fördelningen av negativa eller positiva fall är lika oberoende om tumören är benign, lågmalign eller högmalign
6. Fördelningen av negativa, svagt positiva eller starkt positiva fall är lika oberoende om tumören är benign, lågmalign eller högmalign
7. Fördelningen av negativa och positiva är lika oberoende om tumören är låg eller högmalign

8. Fördelningen av negativa, svagt positiva eller starkt positiva är oberoende om tumören är låg eller högmalign

Data analyserades statistiskt med Chi-Square test och vidare räknades ett Cramer's V tal. Chi-Square test används för att visa ifall korrelation finns mellan 2 olika nominella variabler eller om de är totalt oberoende av varandra. Chi-Square talet (χ^2) används för att räkna ut ett p-värde. P-värdet anger med vilken sannolikhet man har fel i att omkullkasta nollhypotesen, dvs. att de nominella variablerna är totalt oberoende av varandra. Inom medicinsk statistik har ett p-värde på under 0.05 bestämts vara statistiskt signifikant.

Chi Square test anger endast signifikansen av korrelationen mellan två nominella värden. För att visa styrkan av korrelation används Cramer's V. Cramer's V talet (ϕ_c) är ett tal från 0 till 1 och anger hur beroende de nominella variablerna är av varandra. Chi-Square används alltså för att räkna ut hur signifikant korrelationen mellan två nominella variabler är, medan Cramer's V anger hur stark korrelationen är.

Den egna insatsen i arbetet bestod av genomgång av Qpati registrets patientjournaler, väljande av preparat för färgning, mikroskopande av färgade preparat samt analys av dessa. Vidare bestod arbetet av litteraturgranskning, analys av resultaten samt skrivandet av avhandlingen.

4 Resultat

4.1 Patientmaterialet

Materialet bestod slutligen av 59 fall. Av dessa var 23 fall kondrom, 13 fall kondrosarkom gradus 1, 17 fall kondrosarkom gradus 2 och 6 fall kondrosarkom gradus 3.

Av kondrom patienterna var 10 män och 13 kvinnor (Diagram 1.) Åldersfördelningen var mellan 13 – 85 år, med ett medeltal på 48,3 år (Diagram 2.) Patienternas ålder är räknat i hela år till det år då provbiten som använts för studien tagits.

Av kondrosarkom gradus 1 patienterna var 7 män och 7 kvinnor. Åldersfördelningen var 16 – 74 år, med en medelålder på 44,4 år.

Av kondrosarkom gradus 2 patienterna var 10 män och 7 kvinnor. Åldersfördelningen var 23 – 83 år med en medelålder på 51,1 år.

Av kondrosarkom gradus 3 patienterna var 5 män och 1 kvinna. Åldersfördelningen var 50 – 85 år med en medelålder på 64,5 år.

4.2 Tumörernas lokalisation

Tumörernas lokalisation delades in i 4 olika grupper: Distala extremiteters små rörben, långa rörben (t.ex. femur), platta ben (t.ex. scapula) eller odefinierat (Diagram 3.). Till den odefinierade gruppen hör de preparat som angivits som tagna ur mjukvävnad eller som definierats som ett område istället för specifika ben (t.ex. retroperitoneum). En sådan gruppering används ofta i litteraturen.

Av de 23 fallen av kondrom som användes var 14 av tumörerna från distala extremiteters små rörben, 6 från långa rörben, 2 fall från platta ben och 1 fall från odefinierat område.

Av de 14 fall av kondrosarkom gradus 1 som undersöktes var 1 från distala extremiteters små rörben, 5 från långa rörben, 6 från platta ben och 2 från odefinierat område.

Av de 17 fall av kondrosarkom gradus 2 som undersöktes var 1 från distala extremiteters små rörben, 5 från långa rörben, 2 från platta rörben och 9 från odefinierat område.

Av de 6 fall av kondrosarkom gradus 3 som undersöktes var inga fall från distala extremiteters små rörben, 2 av fallen från långa rörben, inga fall från de platta benen och 4 fall var från odefinierat område.

4.3 Mikroskopisk analys av IHK färgade preparat

För analys av färgningen användes 3 olika nivåer av positivitet för AZIN2, i form av negativ – svagt positiv – starkt positiv. I tabell 1 används beteckningen ”-” för negativ, ”+” för svagt positiv samt ”++” för starkt positiv. Analysen gjordes subjektivt, med följande kriterier: Ett negativt preparat hade inga eller endast mycket få och svaga tecken på positivitet. Ett svagt positivt preparat hade en klar positivitet, men området av preparatet med klar positivitet var under 50 % samt cellerna hade svagare färgning än i ett starkt preparat. I ett starkt positivt preparat hade cellerna färgats starkt samt området av preparat som kunde ses positivt var över 50 %.

Av de 23 fall av kondrom som undersöktes var 2 (8,7 %) negativa, 9 (39,1 %) svagt positiva och 12 (52,2 %) starkt positiva. Totalt var 21 av 23 fall positiva (91,3%).

Av de 14 fall av kondrosarkom gradus 1 som undersöktes var 2 (14,3 %) negativa, 6 (42,9 %) svagt positiva och 6 (42,9 %) starkt positiva. Totalt var 12 av 14 fall positiva (85,7 %).

Av de 17 fall av kondrosarkom gradus 2 som undersöktes var 7 (41,2%) negativa, 4 (23,5 %) svagt positiva och 6 (35,3 %) starkt positiva. Totalt var 10 av 17 fall positiva (58,8 %).

Av de 6 fall av kondrosarkom gradus 3 som undersöktes var 2 (33,3 %) fall negativa, 3 (50 %) svagt positiva och 1 (16,7 %) fall starkt positivt. Totalt var 4 av 6 fall positiva (66,7%).

Resultaten av den mikroskopiska analysens finns presenterade i tabell 1 och diagram 4.

4.4 Statistisk analys av preparaten

Den första nollhypotesen var att nivån av positivitet inte korrelerar med om tumören var benign eller malign. Fynden visar att frekvensen av positivitet inte korrelerar signifikant med om tumören är benign eller malign. ($\chi^2 (1) = 3.15$, $p = 0.076$, $\phi_c = 0.231$)

Den andra nollhypotesen var att frekvensen av positivitet inte korrelerar med tumörens malignitetsgrad. Fynden visar att frekvensen av positivitet korrelerar signifikant med tumörens malignitetsgrad. ($\chi^2 (3) = 8.39$, $p=0.039$, $\phi_c = 0.377$)

Den tredje nollhypotesen var att graden av positivitet inte korrelerar med om tumören var benign eller malign. Fynden visar att graden av positivitet inte korrelerar signifikant med om tumören är benign eller malign. ($\chi^2 (2) = 3,40$, $p = 0.183$, $\phi_c = 0.24$)

Den fjärde nollhypotesen var att graden av positivitet inte korrelerar med tumörens malignitetsgrad. Fynden visar att graden av positivitet inte korrelerar signifikant med tumörens malignitetsgrad. ($\chi^2 (6) = 9.80$, $p = 0.133$, $\phi_c = 0.288$)

Den femte nollhypotesen var att frekvensen av positivitet inte korrelerar med om tumören klassades som benign/lågmalign/högmalign. Fynden visar att frekvensen av positivitet korrelerar signifikant med benign/lågmalign/högmalign indelning av tumörer. ($\chi^2 (2) = 8.220$, $p = 0.016$, $\phi_c = 0.373$)

Den sjätte nollhypotesen var att graden av positivitet inte korrelerar med om tumören klassades som benign/lågmalign/högmalign. Fynden visar att graden av positivitet inte korrelerar signifikant med benign/lågmalign/högmalign indelning av tumörer. ($\chi^2 (4) = 8.472$, $p = 0.076$, $\phi_c = 0.268$)

Den sjunde nollhypotesen var att frekvensen av positivitet inte korrelerar med om tumören klassades som lågmalign eller högmalign. Fynden visar att frekvensen av positivitet korrelerar signifikant med lågmalign/högmalign indelning av tumörer. ($\chi^2 (1) = 8.215$, $p = 0.004$, $\phi_c = 0.373$)

Den åttonde nollhypotesen var att graden av positivitet inte korrelerar med om tumören klassades som lågmalign eller högmalign. Fynden visar att graden av positivitet korrelerar signifikant med lågmalign och högmalign indelning av tumörer. ($\chi^2 (2) = 8.287$, $p = 0.016$, $\phi_c = 0.375$)

En sammanfattning av den statistiska analysens resultat finns presenterad i tabell 2.

4.5 Tabeller och diagram

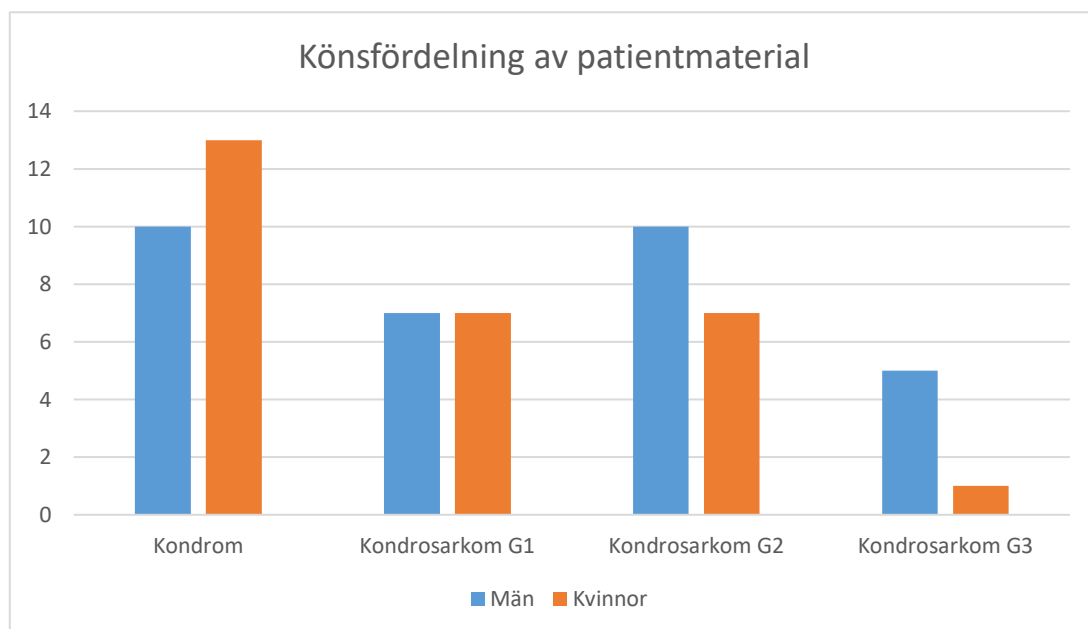


Diagram 1. Könsfördelning inom de olika tumörgrupperna

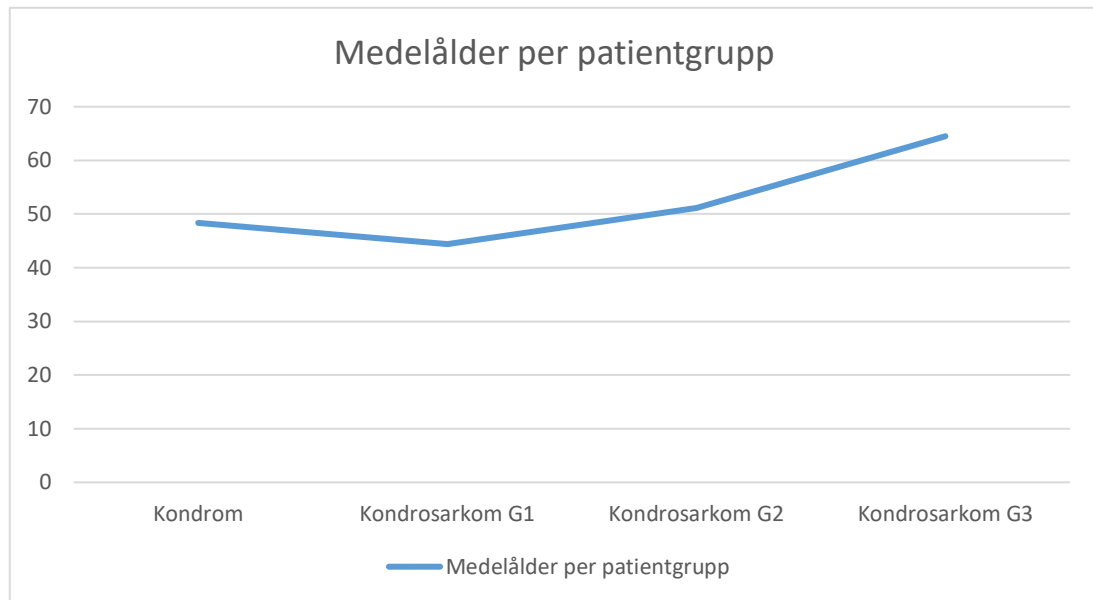


Diagram 2. Medelåldern inom de olika tumörgrupperna

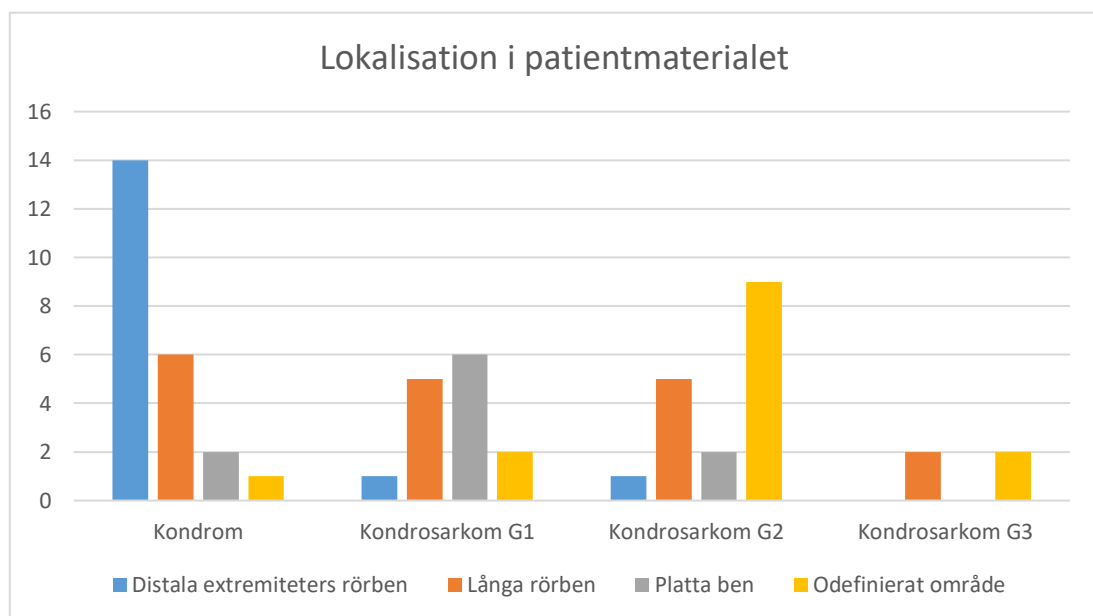


Diagram 3. Lokalisation inom de olika tumörgrupperna

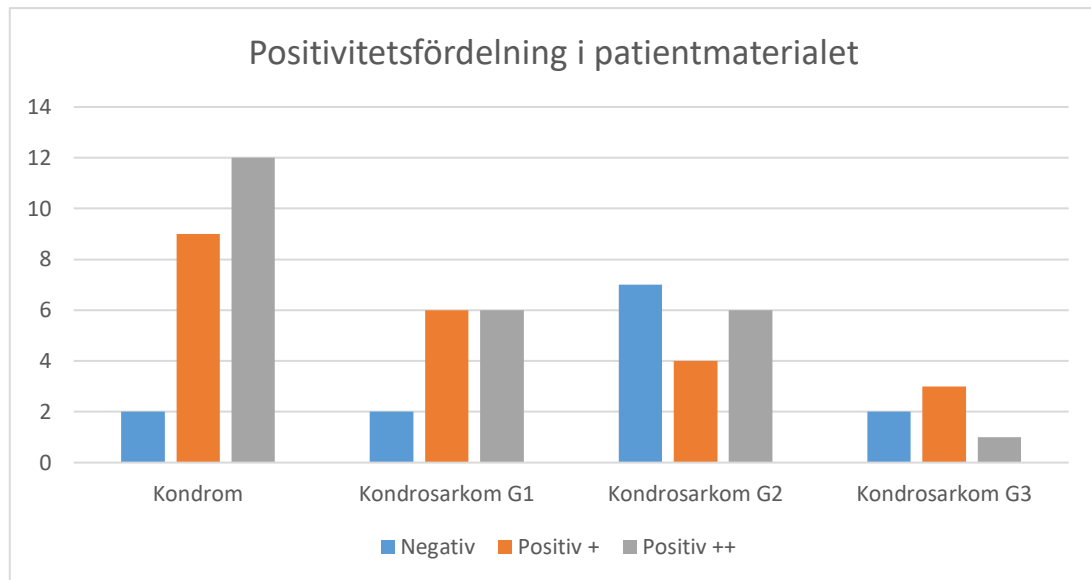


Diagram 4. Positivitetsfördelning inom de olika tumörgrupperna

Diagnos	-	+	++	Positiva / totalt fall
Kondrom	2	9	12	21/23 (91,3%)
Kondrosarkom G1	2	6	6	12/14 (85,7%)
Kondrosarkom G2	7	4	6	10/17 (58,8%)
Kondrosarkom G3	2	3	1	4/6 (66,7%)

Tabell 1. Resultat av mikroskopiska analysen

Nollhypotes	$(df) \chi^2$	p	ϕ_c
1. Frekvensen av positivitet korrelerar inte med om tumören är benign eller malign	(1) 3,2	0,074	0,231
2. Frekvensen av positivitet korrelerar inte med tumörens diagnos	(3) 8,4	0,034	0,377
3. Graden av positivitet korrelerar inte med om tumören är benign eller malign	(2) 3,4	0,183	0,24
4. Graden av positivitet korrelerar inte med tumörens diagnos	(1) 9,8	0,133	0,288
5. Frekvensen av positivitet korrelerar inte med om tumören klassats som b/lm/hm	(2) 8,2	0,016	0,373
6. Graden av positivitet korrelerar inte med om tumören klassats som b/lm/hm	(4) 8,472	0,076	0,268
7. Frekvensen av positivitet korrelerar inte med om tumören klassats som lm/hm	(1) 8,215	0,004	0,373
8. Graden av positivitet korrelerar inte med om tumören klassats som lm/hm	(2) 8,287	0,016	0,375

Tabell 2. Resultat av den statistiska analysen

4.6 Bilder

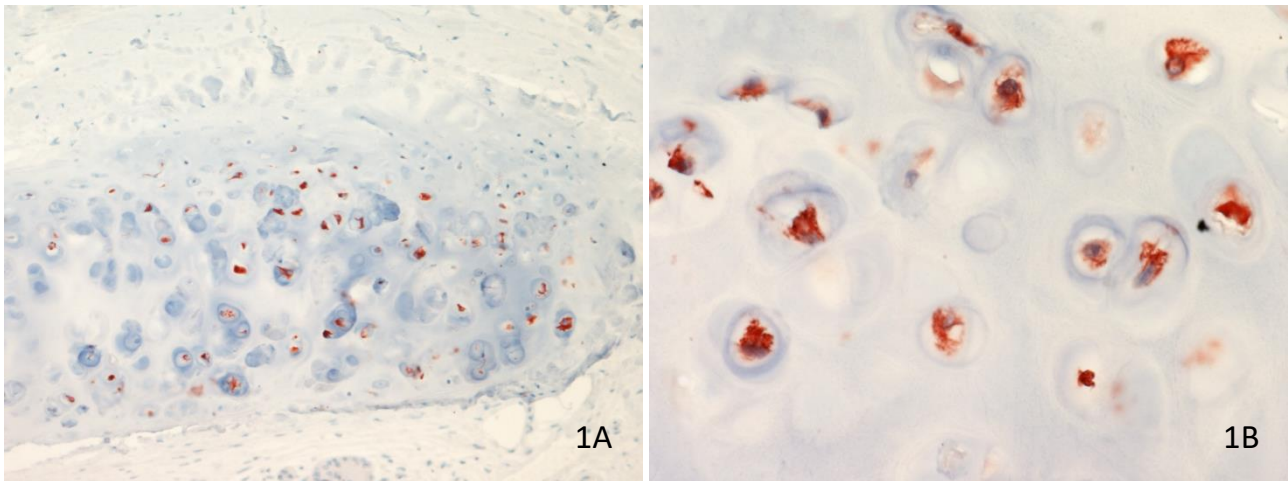


Bild 1. Normal broskvävnad färgad med K3. Bild 1A med 10x förstoring, bild 1B 400x.

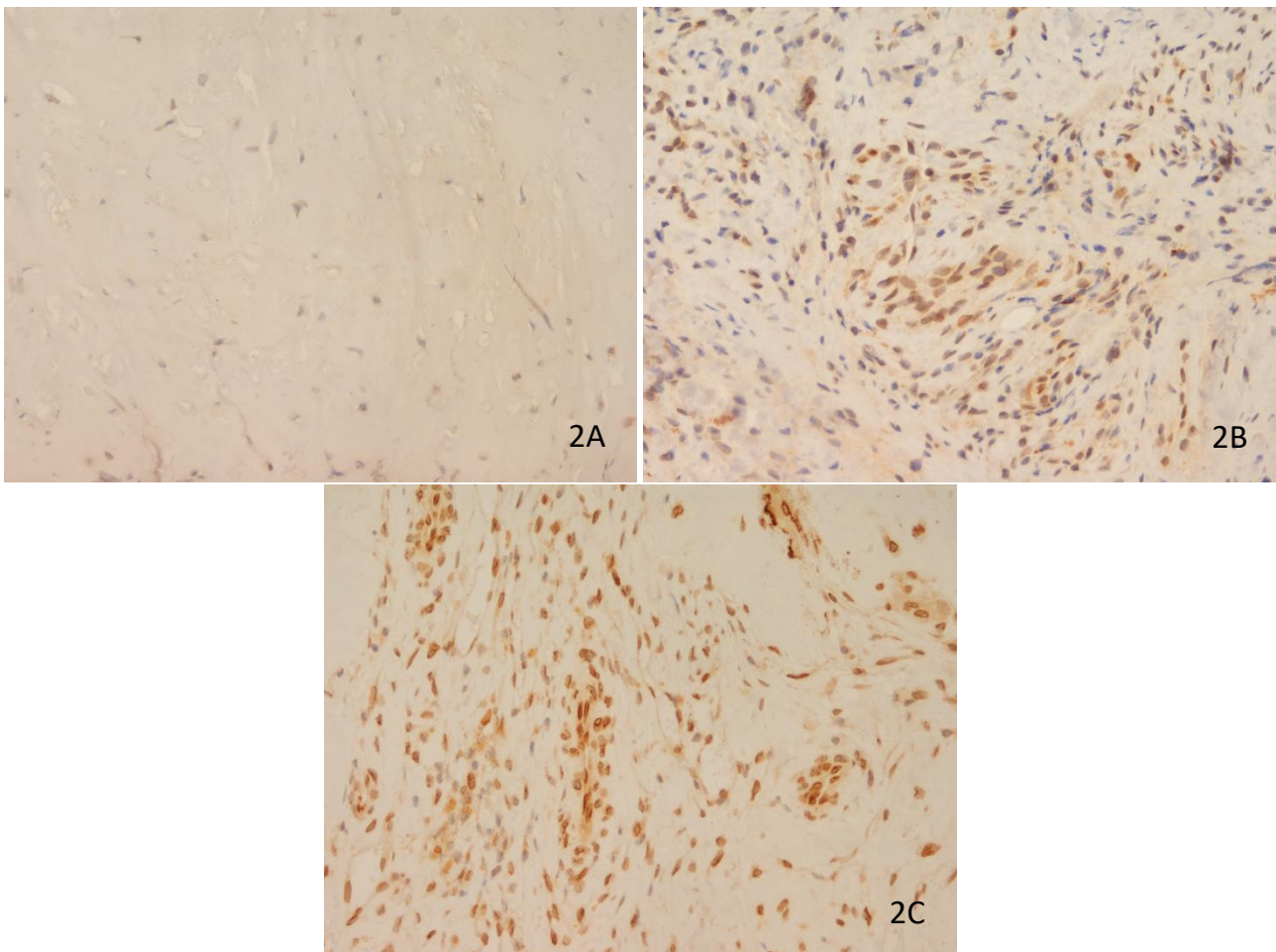


Bild 2. Kondrom med 20x förstoring. Bild 2A ses ett negativt preparat, bild 2B ett svagt positivt och bild 2C ses ett starkt positivt preparat.

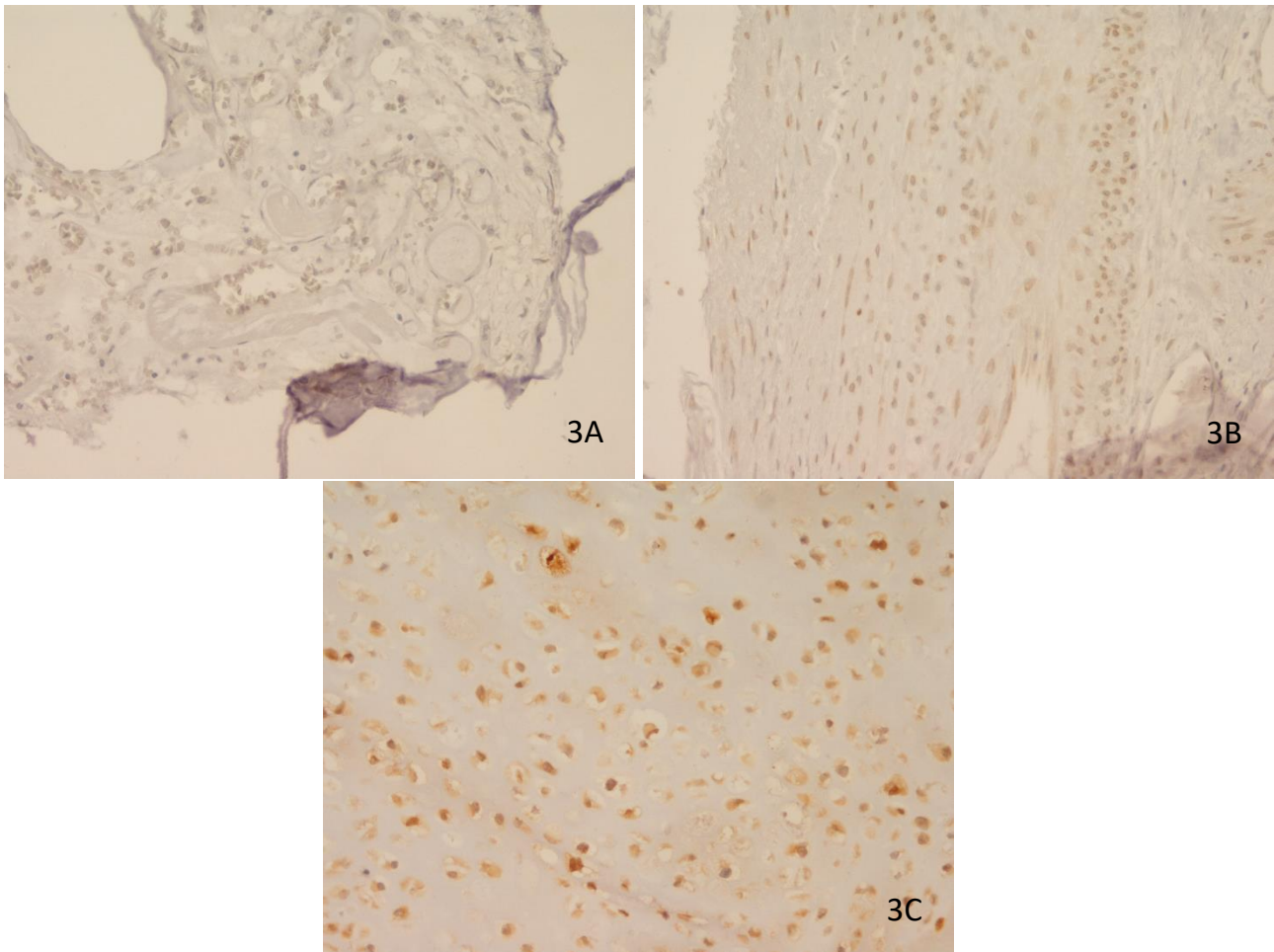
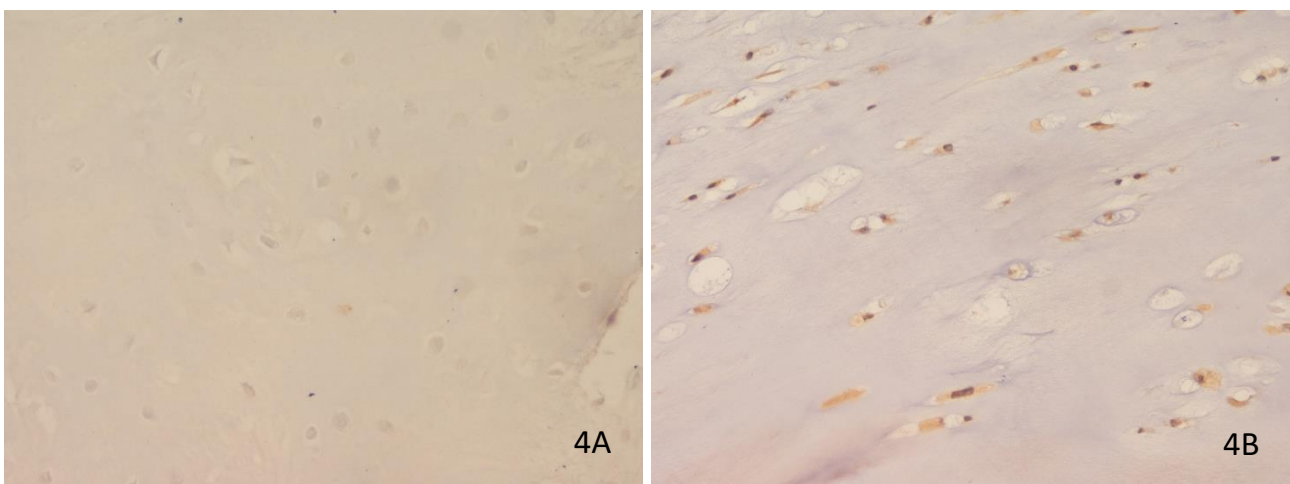


Bild 3. Kondrosarkom gradus 1 med 20x förstoring. Bild 3A ses ett negativt preparat, bild 3B ett svagt positivt och bild 3C ses ett starkt positivt preparat.



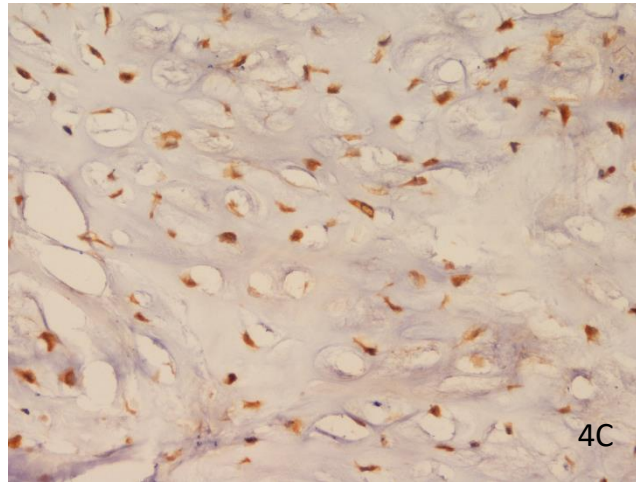


Bild 4. Kondrosarkom gradus 2 med 20x förstoring. Bild 4A ses ett negativt preparat, bild 4B ett svagt positivt och bild 4C ses ett starkt positivt preparat.

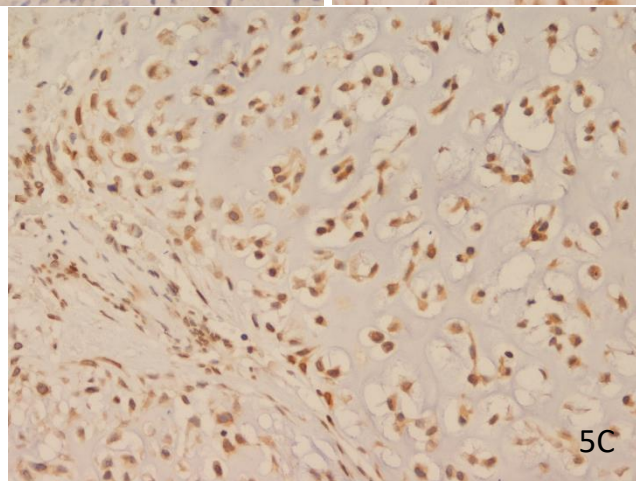
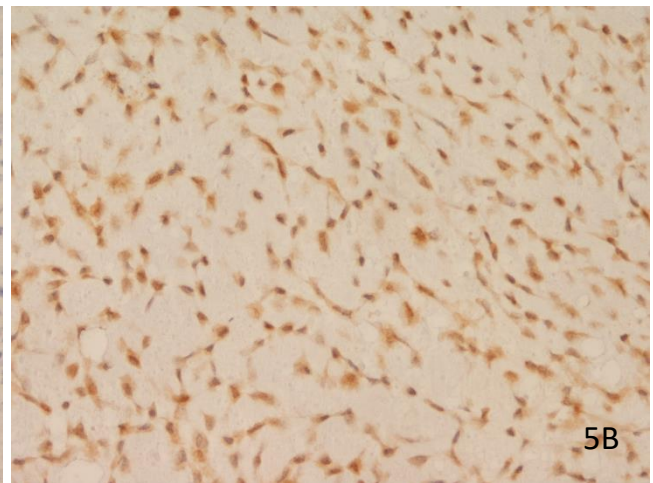
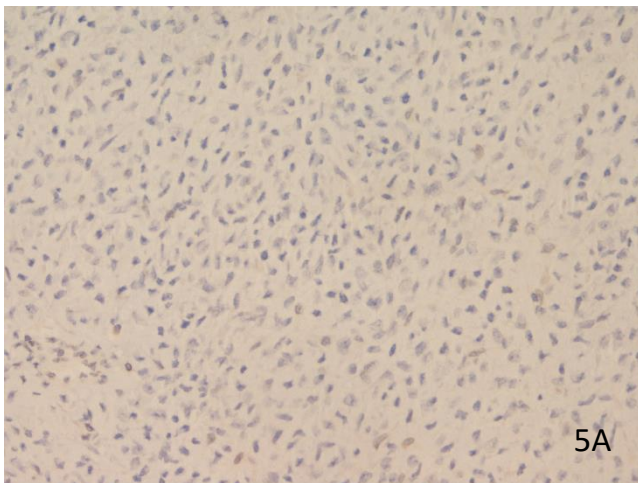


Bild 5. Kondrosarkom gradus 3 med 20x förstoring. Bild 5A ses ett negativt preparat, bild 5B ett svagt positivt och bild 5C ses ett starkt positivt preparat.

5 Diskussion

Studiens syfte var att undersöka uttrycket av AZIN2 i kondrom och olika grader av kondrosarkom. Målsättningen var att undersöka ifall expressionen var olika i benigna och maligna tumörer och ifall expressionen korrelerade med tumörens malignitetsgrad, vilket kunde betyda att AZIN2 kunde användas som diagnostisk markör.

Vid materialinsamlingen fanns två kriterier för preparatet: Den primära diagnosen samt hur den histologiska diagnosen gjorts, dvs. typen av preparat (biopsi versus post-operativt preparat). Resultaten visar att materialet väl motsvarar litteraturen rörande åldersincidens och könsfördelning. (3,14) I fallen av kondrom stämmer medelåldern överens med litteraturen och i fallen av kondrosarkom ser åldersfördelningen ut som förväntad med en korrelation mellan stigande medelålder och högre malignitetsgrad av kondrosarkom. Även könsfördelningen stämmer överens med tidigare uppgifter och litteraturen, med en i stort sett jämn fördelning mellan män och kvinnor för kondrom med en viss predisposition för kondrosarkom hos män. (14) Denna trend märks speciellt vid stigande malignitetsgrader av kondrosarkom.

Lokalisationen av tumörerna överensstämmer med tidigare litteratur. (7) En majoritet av kondromen fanns i de distala extremiteternas små rörben, medan kondrosarkom endast i enstaka fall förekom distalt. Detta stämmer både överens med definitionerna av kondrom och kondrosarkom men kan också tänkas hänga ihop med diagnostiken. Som tidigare sades är det mycket svårt att skilja kondrom från kondrosarkom av låg gradus och ofta måste tumörens lokalisering tas med i diagnostiken. Detta kunde bidra till att tumörer i distala extremiteter lättare diagnostiserats som kondrom. Detta togs i beaktande vid klassificeringen av tumörerna i lågmaligna/högmaligna. Resultaten visade också att mängden tumörer från odefinierade områden ökar vid högre malignitetsgrader av kondrosarkom. Detta kan förklaras med tumörens aggressivitet, dvs. det infiltrativa tillväxtsättet. Preparaten hade alltså tagits från tumörer som vuxit in i mjukvävnad omkring benet, vilket gjort att tumörens lokalisation klassificerats odefinierad.

Man kan alltså konstatera att materialet stämmer överens med det som presenterades i inledningen.

Den mikroskopiska analysen av preparaten färgade med antikroppar mot AZIN2 gav följande frekvens av positivitet per diagnos: Kondrom 91,3%, Gradus 1 kondrosarkom 85,7%, Gradus 2

kondrosarkom 58,8%, Gradus 3 kondrosarkom 66,7%. Från detta kan man dra en slutsats. Frekvensen av positivitet är högre för benigna tumörer än maligna.

Med tanke på de liknande morfologiska och biologiska egenskaperna mellan ett benigt kondrom och ett låggradigt kondrosarkom är den liknande AZIN2 positiviteten förväntad. Inga tydliga skillnader sågs i uttrycket mellan män och kvinnor. För att undersöka ifall tumörens lokalisering har påverkan i uttrycket borde detta redan ha beaktats vid materialinsamlingen. Eftersom utredningen av detta inte var en av frågeställningarna i studien kan vi inte dra slutsatser om uttrycket av AZIN2 i relation till tumörens lokalisering.

Efter detta utfördes en statistisk analys för att vidare undersöka resultaten. För detta ställdes 8 nollhypoteser som skulle motbevisas. Den gemensamma faktorn i hypoteserna var att frekvensen av AZIN2 positivitet inte skulle korrelera med tumörens diagnos. Vidare grupperades tumörerna enligt sina kliniska egenskaper för att öka på analysens styrka.

Resultaten av den statistiska analysen bekräftade till viss del det som redan anförts. Upplägget för analysen var att direkt kunna svara på de frågor som ställdes före studien. Tilläggsfrågor ställdes också för att närmare analysera AZIN2 expressionen i kliniskt intressanta frågeställningar.

Den första nollhypotesen kunde inte omkullkastas ($p = 0,076$) men detta kunde förklaras med att antalet maligna tumörer överstiger de benigna tumörerna med en stor andel (kondrom $n = 23$, kondrosarkom $n = 38$). Resultatet kan ändå tolkas som att en korrelation finns, även om den inte är statistiskt signifikant.

Den andra nollhypotesen kunde omkullkastas ($p = 0,039$, $\phi_c = 0.377$), vilket visar att frekvensen av AZIN2 positivitet korrelerar med stigande grad av malignitet. Man kunde alltså visa att AZIN2 uttrycket sjunker när man går från kondrom till högre grader av kondrosarkom.

Den tredje och fjärde nollhypotesen kunde inte omkullkastas ($p = 0,183$, $p = 0,133$). Man kunde alltså inte visa att positivitetsgraden sjunker när man jämför benigna eller maligna tumörer eller när man går från kondrom till kondrosarkom gradus 1, gradus 2 eller gradus 3.

Den femte nollhypotesen kunde omkullkastas ($p = 0,016$, $\phi_c = 0.373$), vilket visar att frekvensen av positivitet korrelerar med om tumören klassificerats som benign, lågmalign eller högmalign. Den sjätte nollhypotesen kunde också omkullkastas ($p = 0,076$), vilket visar att även positivitetsgraden korrelerar med samma tumörklassificering. Något som starkt kunde bevisas var alltså att

expressionen av AZIN2 sjunker när man går från kondrom till kondrosarkom gradus 1 och vidare i högre grader av kondrosarkom.

Den sjunde nollhypotesen kunde omkullkastas ($p = 0.004$, $\phi_c = 0.373$), vilket visar att frekvensen av positivitet korrelerar med om man klassificerar tumörer som lågmaligna till högmaligna. Den åttonde nollhypotesen kunde också omkullkastas ($p = 0.016$, $\phi_c = 0.375$), vilket visar att även positivetsgraden korrelerar med samma tumörklassificering. Det som starkt kunde bevisas var att expressionen av AZIN2 sjunker om man jämför lågmaligna tumörer (kondrom eller kondrosarkom gradus 1) med högmaligna tumörer (kondrosarkom gradus 2 eller 3).

Slutsatserna som kan dras från den statistiska analysen är alltså att uttrycket av AZIN2 verkligen sjunker när man går från kondrom till kondrosarkom av olika grader. En signifikant skillnad kunde inte påvisas mellan benigna och maligna tumörer, vilket betyder att AZIN2 inte verkar ge tilläggsnytta vid klinisk differentialdiagnostik. Om man däremot uppfattar graderingen av kondrosarkom mera som ett spektrum istället för en klar indelning ser man att uttrycket av AZIN2 starkt korrelerar med malignitetsgraden av tumören.

Resultaten av studien ger ny insikt i AZIN2 molekylen cellulära roll. Som tidigare definierats är kondrom och kondrosarkom tumörer som utgått från stamceller som differentierar mot kondrocyter. Broskvävnad består av kondrocyter som producerar extracellulärt matrix och tillsammans bildar dessa broskvävnad. AZIN2 eller antizym inhibitor 2 har som uppgift att inhibera antizym som i sin tur inhiberar ODC samt inhiberar upptagningen av polyaminer via endocytos. På detta sätt styrs den intracellulära koncentrationen av polyaminer. AZIN2 har också hittats vara vävnadsspecifik med speciellt hög expression i celler som producerar extracellulärt material, t.ex. kondrocyter. I denna studie konstaterades att uttrycket av AZIN2 minskar i korrelation till malignitetsgraden av en neoplasia av brosk. Per definition minskar mängden av extracellulärt matrix vid högre malignitetsgrad. Ett annat kännetecken för högre grader av kondrosarkom är den ökade mängden mitoser. Detta är viktigt, för vad studien visar är att AZIN2 verkligen verkar ha ett samband med mängden extracellulärt material som produceras.

Studien har begränsningar. Materialet består endast av 61 patienter totalt, med det högsta antalet patienter i gruppen benign kondrom (23 fall totalt) och det minsta antalet i kondrosarkom gradus 3 (6 fall totalt). Till exempel skillnaden i positivitet mellan gradus 2 och gradus 3 kan tänkas ha att göra med skillnaden i fall (17 fall av gradus 2 och 6 fall av gradus 3). Man skall ändå komma ihåg

att gradus 3 kondrosarkom är ytterst ovanliga vilket är en faktor som inte kan påverkas. Trenden tyder ändå på att uttrycket av AZIN2 sjunker med stigande malignitet. En annan begränsande faktor visade sig vara de tekniska svårigheterna i att få preparaten färgade. Flera fall krävde omfärgning innan man kunde ta ställning till preparatets positivitet. En tredje begränsande faktor är att preparaten analyserades subjektivt. Skillnaden mellan ett svagt positivt preparat och ett starkt positivt preparat var inte alltid helt tydlig. Detta kunde göras bättre genom t.ex. digital analys med kvantifierade kriterier för positivitetsskalan. Frågeställningen i denna studie var ändå om preparatet var positivt eller inte, vilket nog kan anses vara möjligt att ge svar på utan digitala hjälpmedel.

För att sammanfatta kan man konstatera att expressionen av AZIN2 är lägre i maligna tumörer än i benigna, samt att AZIN2 expressionen minskar med högre grad av kondrosarkom. Detta ger fingervisning om att AZIN2 expressionen sjunker i takt med differentieringsgraden av kondrocyter samt att AZIN2 har en roll i den intracellulära produktionen av extracellulärt material. Större studier krävs ändå för att ge en mera bestämd slutsats.

6 Litteratur

- (1) Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. Histology: A text and Atlas, with correlated cell and molecular biology. 6th ed. PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
- (2) Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Bones, Joints and Soft Tissue Tumors. Robbins Basic Pathology. 9th ed.: Elsevier Saunders; 2013.
- (3) Böhling T, Parkkinen J. Luusto ja Luun Sairaudet. Patologia. 2nd ed. Finland: Duodecim; 2011.
- (4) Ngai C, Ding DY, Rapp TB. Maffucci Syndrome. An Interesting Case and a Review of the Literature. Bull Hosp Jt Dis (2013) 2015 Dec;73(4):282-285.
- (5) Brien EW, Mirra JM, Kerr R. Benign and malignant cartilage tumors of bone and joint: their anatomic and theoretical basis with an emphasis on radiology, pathology and clinical biology. I. The intramedullary cartilage tumors. Skeletal Radiol 1997 Jun;26(6):325-353.
- (6) Gelderblom H, Hogendoorn PC, Dijkstra SD, van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiau AH, et al. The clinical approach towards chondrosarcoma. Oncologist 2008 Mar;13(3):320-329.
- (7) Bergovec M, Kubat O, Smerdelj M, Seiwerth S, Bonevski A, Orlic D. Epidemiology of musculoskeletal tumors in a national referral orthopedic department. A study of 3482 cases. Cancer Epidemiol 2015 Jun;39(3):298-302.

- (8) Leddy LR, Holmes RE. Chondrosarcoma of bone. *Cancer Treat Res* 2014;162:117-130.
- (9) Bjornsson J, McLeod RA, Unni KK, Ilstrup DM, Pritchard DJ. Primary chondrosarcoma of long bones and limb girdles. *Cancer* 1998 Nov 15;83(10):2105-2119.
- (10) Gulia A, Puri A, Byregowda S. Staging investigations in chondrosarcoma: Is evaluation for skeletal metastases justified? Analysis from an epidemiological study at a tertiary cancer care center and review of literature. *South Asian J Cancer* 2016 Jan-Mar;5(1):3-4.
- (11) Bovee JV, Hogendoorn PC, Wunder JS, Alman BA. Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2010 Jul;10(7):481-488.
- (12) Cancerregister F. Årligt medeltal av nya fall av cancer 1968-2014, enligt primärlokalisering och period, kvinnor. 2016; Available at: www.cancerregistret.fi. Accessed 03/05, 2016.
- (13) Cancerregister F. Årligt medeltal av nya fall av cancer 1968-2014, enligt primärlokalisering och period, män. 2016; Available at: www.cancerregistret.fi. Accessed 03/05, 2016.
- (14) Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft tissue and Bone. Lyon, France: IARC Press; 2002.
- (15) Lindholm P, Kivioja A. Luusarkooma. Syöpätaudit: Duodecim; 2013.
- (16) Ho L, Stojanovski A, Whetstone H, Wei QX, Mau E, Wunder JS, et al. Gli2 and p53 cooperate to regulate IGFBP-3- mediated chondrocyte apoptosis in the progression from benign to malignant cartilage tumors. *Cancer Cell* 2009 Aug 4;16(2):126-136.
- (17) Yoshitaka T, Kawai A, Miyaki S, Numoto K, Kikuta K, Ozaki T, et al. Analysis of microRNAs expressions in chondrosarcoma. *J Orthop Res* 2013 Dec;31(12):1992-1998.
- (18) Nugent M. microRNA and Bone Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2015;889:201-230.
- (19) Shariat Torbaghan S, Ashouri M, Jalayer Naderi N, Baherini N. Histopathologic Differentiation between Enchondroma and Well-differentiated Chondrosarcoma: Evaluating the Efficacy of Diagnostic Histologic Structures. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2011 Summer;5(3):98-101.
- (20) Mirra JM, Gold R, Downs J, Eckardt JJ. A new histologic approach to the differentiation of enchondroma and chondrosarcoma of the bones. A clinicopathologic analysis of 51 cases. *Clin Orthop Relat Res* 1985 Dec;(201)(201):214-237.
- (21) Zhang L, Yang M, Mayer T, Johnstone B, Les C, Frisch N, et al. Use of MicroRNA biomarkers to distinguish enchondroma from low-grade chondrosarcoma. *Connect Tissue Res* 2016 Jun 7:1-7.
- (22) Eefting D, Schrage YM, Geirnaerdt MJ, Le Cessie S, Taminiau AH, Bovee JV, et al. Assessment of interobserver variability and histologic parameters to improve reliability in classification and grading of central cartilaginous tumors. *Am J Surg Pathol* 2009 Jan;33(1):50-57.
- (23) Skeletal Lesions Interobserver Correlation among Expert Diagnosticians (SLICED) Study Group. Reliability of histopathologic and radiologic grading of cartilaginous neoplasms in long bones. *J Bone Joint Surg Am* 2007 Oct;89(10):2113-2123.

- (24) Riedel RF, Larrier N, Dodd L, Kirsch D, Martinez S, Brigman BE. The clinical management of chondrosarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 2009 Apr;10(1-2):94-106.
- (25) Fayad LM, Ahlawat S, Khan MS, McCarthy E. Chondrosarcomas of the hands and feet: A case series and systematic review of the literature. *Eur J Radiol* 2015 Oct;84(10):2004-2012.
- (26) Lee FY, Mankin HJ, Fondren G, Gebhardt MC, Springfield DS, Rosenberg AE, et al. Chondrosarcoma of bone: an assessment of outcome. *J Bone Joint Surg Am* 1999 Mar;81(3):326-338.
- (27) Casero RA, Jr, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007 May;6(5):373-390.
- (28) Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 May 19;271(3):559-564.
- (29) Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res* 1988 Feb 15;48(4):759-774.
- (30) Hayashi S, Murakami Y, Matsufuji S. Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends Biochem Sci* 1996 Jan;21(1):27-30.
- (31) Gerner EW, Meyskens FL, Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* 2004 Oct;4(10):781-792.
- (32) Heller JS, Fong WF, Canellakis ES. Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976 Jun;73(6):1858-1862.
- (33) Coffino P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Mar;2(3):188-194.
- (34) Mangold U. Antizyme inhibitor: mysterious modulator of cell proliferation. *Cell Mol Life Sci* 2006 Sep;63(18):2095-2101.
- (35) Kanerva K, Lappalainen J, Makitie LT, Virolainen S, Kovanen PT, Andersson LC. Expression of antizyme inhibitor 2 in mast cells and role of polyamines as selective regulators of serotonin secretion. *PLoS ONE* 2009;4(8):e6858.
- (36) Makitie LT, Kanerva K, Polvikoski T, Paetau A, Andersson LC. Brain neurons express ornithine decarboxylase-activating antizyme inhibitor 2 with accumulation in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2010 May;20(3):571-580.
- (37) Makitie LT, Kanerva K, Sankila A, Andersson LC. High expression of antizyme inhibitor 2, an activator of ornithine decarboxylase in steroidogenic cells of human gonads. *Histochem Cell Biol* 2009 Dec;132(6):633-638.
- (38) Kanerva K, Makitie LT, Pelander A, Heiskala M, Andersson LC. Human ornithine decarboxylase paralogue (ODCp) is an antizyme inhibitor but not an arginine decarboxylase. *Biochem J* 2008 Jan 1;409(1):187-192.
- (39) Kanerva K, Makitie LT, Back N, Andersson LC. Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor 2 regulates intracellular vesicle trafficking. *Exp Cell Res* 2010 Jul 1;316(11):1896-1906.

(40) Rasila T, Lehtonen A, Kanerva K, Mäkitie LT, Haglund C, Andersson LC. Expression of ODC Antizyme Inhibitor 2 (AZIN2) in Human Secretory Cells and Tissues. PLoS One 2016 Mar 10;11(3):e0151175.